



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

Desarrollo y caracterización de nano-portadores lipídicos
cargados con praziquantel para su potencial uso como
control de *Neobenedenia sp.* en *Seriola rivoliana*

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Arturo Figueroa Espinoza

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2019

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 8:00 horas del día 12 del mes de agosto del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Desarrollo y caracterización de nano-portadores lipídicos cargados con praziquantel para su potencial uso como control de *Neobenedenia sp.* en *Seriola rivoliana*"

Presentada por el alumno:

Arturo Figueroa Espinoza

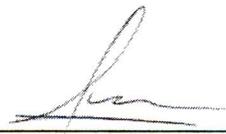
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

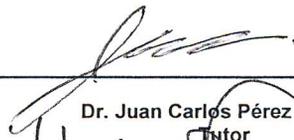
LA COMISIÓN REVISORA



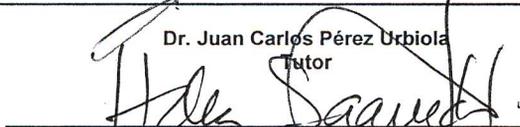
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Resumen

La piscicultura marina es un campo productivo de alto interés comercial. Particularmente, en México se cultiva el atún y el jurel. No obstante, las condiciones de los cultivos masivos, confinados en volúmenes reducidos promueven la llegada de infestaciones parasíticas, como es el caso de los problemas causados por la Clase Monogenea. Las medidas de control actuales consisten en baños con agua dulce o peróxido de hidrogeno, o bien con el uso de antihelmínticos como el praziquantel. Dicho fármaco con un alto efecto contra los monogéneos, sin embargo, su hidrofobicidad, farmacocinética y las propiedades organolépticas que presenta limitan su aplicación en el medio marino a cultivos de peces. Las nanopartículas lipídicas representan una alternativa viable para la administración de fármacos por la vía oral, protegiendo al fármaco y reduciendo la dosis administrada gracias a la liberación sostenida de sustancias incorporadas. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar, caracterizar y evaluar una formulación de praziquantel incorporado a nanoportadores lipídicos. Utilizando la técnica de ultra-sonicación se obtuvieron nanopartículas de ácido esteárico y aceite de hígado de bacalao, con un diámetro de ~200 nm ($Pdl = 0.2 \pm 0.02$; $pZ = 30 \pm 2$). La eficiencia de encapsulación del praziquantel en los nanoportadores lipídicos fue de $87 \% \pm 3$, calculada por la validación del método de cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis. La presencia del fármaco dentro los nanoportadores de comprobó mediante el análisis de FT-IR, mientras que la forma de la estructura fue observada con microscopia electrónica de barrido. La formulación fue incorporada a alimento comercial y se realizó un ensayo de aceptación por parte de jureles (*Seriola rivoliana*), del cual se obtuvieron resultados favorables administrando una dosis de 50 mgkg^{-1} PC, pero sin ninguna diferencia significativa entre el tratamiento de praziquantel encapsulado y el de praziquantel libre. La actividad antihelmíntica de los alimentos producidos para el ensayo de palatabilidad fue evaluada *in vitro* contra parásitos monogéneos del género *Neobenedenia* extraídos de peces infectados, se observaron las variables de desprendimiento de la superficie y huevos producidos durante 18 h para comparar los tratamientos, el análisis estadístico mostró diferencia significativa con respecto a los huevos producidos entre los tratamientos con praziquantel y los que no contenían el fármaco, cabe mencionar que no hubo diferencia entre el tratamiento de praziquantel libre en el agua de mar y encapsulado, lo que prueba la efectividad de la formulación. Por lo anterior, el uso de nanopartículas lipídicas cargadas con praziquantel es una alternativa potencial para el control de infestaciones de *Neobenedenia sp.* en cultivos de *S. rivoliana*.

Palabras clave: Monogenea, Tratamiento, Acuicultura

Summary

Marine fish farming is a productive field of high commercial interest. Particularly, in Mexico the genera *Thunnus* and *Seriola* are cultivated. However, the conditions of massive crops, confined in small volumes, promote parasitic infestations, as is the case of the problems caused by *Monogenea*. Current control treatments consist of baths with fresh water or hydrogen peroxide, or with the use of anthelmintic drugs such as praziquantel. This drug has a high effectivity against *Monogenea*, however, its hydrophobicity, pharmacokinetics and organoleptic properties limit the application to fish crops in the marine environment. Lipid nanoparticles represent a viable alternative for oral administration of drugs, protecting the drug and reducing the dose administered thus the sustained release of incorporated substances. The aim of this work was to develop, characterize and evaluate a formulation of praziquantel incorporated into lipid nanocarriers. Using the ultrasonication method, stearic acid and cod liver oil nanoparticles were obtained, with a diameter of ~ 200 nm (Pdl = 0.2 ± 0.02 ; pZ = 30 ± 2). The encapsulation efficiency of praziquantel in lipid nanocarriers was $87 \% \pm 3$, calculated by the validation of the quantification method by UV-Vis spectrophotometry. The presence of the drug within the nanocarriers was checked by FT-IR analysis, while the shape of the structure was observed with scanning electron microscopy. The formulation was incorporated into commercial food and an acceptance test was carried out with *Seriola rivoliana* fishes, which favorable results were obtained by administering a dose of 50 mgkg^{-1} BW, but without any significant difference between the treatment of encapsulated praziquantel and that of free praziquantel. The anthelmintic activity of the food produced for the palatability test was evaluated *in vitro* against monogenic parasites of the genus *Neobenedenia* extracted from infected fishes, the variables of surface shedding and eggs production (during 18 h) were observed to compare the treatments, the statistical analysis showed significant differences with respect to the eggs produced between treatments with praziquantel and those that did not contain the drug, it should be mentioned that there was no difference among the treatments of free praziquantel in seawater and encapsulated, which proves the effectiveness of the formulation. Therefore, the use of lipid nanoparticles loaded with praziquantel is a potential alternative for the control treatment against infestations of *Neobenedenia sp.* in cultures of *S. rivoliana*.

Key words: *Monogenea*, Treatment, Aquaculture

Vo.Bo. Dr. Felipe de Jesús
Ascencio Valle

Vo.Bo. Dr. Sergio Arturo Galindo
Rodríguez

Dedicatoria

A mis padres que son mi única motivación para pertenecer al sistema humano.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por su apertura y apoyo con instalaciones para realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, siendo el becario número 456530.

A la Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) por recibirme en sus instalaciones para llevar a cabo mi estancia de investigación, en el Laboratorio de Farmacotécnica en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por permitirme realizar la continuación de la estancia de investigación con respecto a la formulación de nanoportadores lipídicos, en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas.

A cada uno de los doctores de mi comité de tesis, por su accesibilidad, apoyo y guía invaluable durante todo el proceso de maestría.

A la Dra. María Palmira Daflon Gremião y su alumna de doctorado Natalia Noronha Ferreira por su apoyo interminable en el Laboratorio de Farmacotécnica en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la UNESP.

A la M. en C. Roxana Bertha Inohuye Rivera, por toda su ayuda durante los experimentos realizados.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Acuicultura	1
1.1.1 La importancia de la acuicultura a nivel mundial	1
1.1.2 La piscicultura en México	2
1.2 El pez fuerte <i>Seriola rivoliana</i>	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Indicadores de salud de peces	5
2.2 Agentes parasitarios en piscicultura	7
2.3 Infestaciones de <i>Neobenedenia sp.</i>	8
2.4 Manejo y control de infestaciones parasitarias	8
2.5 Uso de la nanotecnología en parasitología veterinaria y médica	9
2.6 Nanopartículas lipídicas	10
2.7 Praziquantel incorporado a nanopartículas	12
3. HIPÓTESIS	14
3.1 Hipótesis	14
3.2 Pregunta científica	14
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
5. JUSTIFICACIÓN	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Incorporación de Praziquantel a nanoportadores lipídicos	18
6.2 Formulación del nanoportador	18
6.3 Caracterización fisicoquímica de los nanoportadores	20
6.4 Preparación del alimento medicado	21
6.5 Condiciones ambientales	22
6.6 Bioensayo de aceptación del alimento medicado por <i>Seriola rivoliana</i>	22
6.7 Actividad antihelmíntica del alimento cargado con praziquantel encapsulado	22
6.8 Colecta de parásitos	23
6.9 Análisis estadístico	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Formulación de los nanoportadores lipídicos	24
7.1.1 Determinación del sistema de tensoactivos	25
7.1.2 Caracterización físicoquímica	25
7.2 Bioensayos de aceptación al alimento medicado	27
7.2.1 Palatabilidad	27

7.3 Actividad antihelmíntica de los alimentos medicados	28
8. DISCUSIÓN	30
8.1 Formulación de Praziquantel encapsulado en nanoportadores lipídicos	30
8.2 Aceptación de las nanopartículas con praziquantel por parte de <i>S. rivoiliana</i>	31
8.3 Actividad antihelmíntica <i>in vitro</i> de los NLC contra <i>Neobenedenia sp.</i>	32
9. CONCLUSIONES	34
10. LITERATURA CITADA	35

Lista de figuras

Figura 1. Evolución del tamaño de los nanoportadores con respecto al tiempo (los números en las marcas indican el valor de PDI).	24
Figura 2. Fotografía de nanopartículas cargadas con praziquantel por microscopía electrónica de barrido. Mostrando la morfología ovoide de los nanoportadores.	26
Figura 3. Espectros de FT-IR para praziquantel (azul), E4 (rojo) y E4P (verde).	26
Figura 4. Producción de huevos de <i>Neobenedenia sp.</i> a 18 h del ensayo de actividad antihelmíntica con alimentos medicados.	28

Lista de tablas

Tabla I. Diferencias en el comportamiento y la apariencia física externa de un pez sano y de un enfermo. Tomada de Balbuena-Rivarola, E. D. <i>et al.</i> (2011).	6
Tabla II. Formulaciones de nanoportadores para determinar la proporción de aceite de ácido esteárico e hígado de bacalao en la fase lipídica.	19
Tabla III. Sistemas de tensoactivos evaluados en la producción de NLC	19
Tabla IV. Formulaciones de alimento medicado con praziquantel.	21
Tabla V. Valores de HLB resultantes de los sistemas de tensoactivos empleados para preparar las formulaciones de PZQ incorporado a NLC.	25
Tabla VI. Porcentaje de humedad de los alimentos fabricados para el ensayo de palatabilidad.	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Acuicultura

La acuicultura es una actividad que tiene como objetivo la obtención de productos acuáticos por medio de ambientes controlados y constantemente, busca optimizar la eficiencia en rendimiento y calidad. Así mismo tiene alto potencial socio-económico al generar empleos y de bajo impacto para el ambiente. En la práctica deben seguirse planes de manejo para evitar cambios en el hábitat; en dichos planes de incluye el control de la liberación de antibióticos que puedan promover resistencias en patógenos o en su defecto, afectar a las especies nativas no aprovechables (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004; Borja, 2002; Grossi-Dopico, 2010; Martínez-Porchas y Martínez-Cordova, 2012; Ottinger *et al.*, 2016; Primavera, 2006). Actualmente, los productos acuícolas incluyen algas, moluscos, crustáceos y peces, tanto de agua dulce como de agua marina.

1.1.1 La importancia de la acuicultura a nivel mundial

La FAO reporta que la acuicultura es la actividad con mayor tasa crecimiento entre los demás sectores de producción de alimentos. En 2016, 37 países produjeron más peces de los que capturaron del medio natural. La producción acuícola mundial llegó a 110.2 millones de toneladas, 80 de ellos pertenecientes a productos comestibles, representando el 41% de la producción pesquera anual. Del total de especies comestibles, 54.1 millones de toneladas corresponden a los peces, teniendo un valor calculado de 138 500 millones de dólares (FAO, 2018).

1.1.2 La piscicultura en México

La acuicultura en México es definida, desde 1923, como “el aprovechamiento de las aguas y riberas para la cría y reproducción de animales” (INAES, 2018). Desde tiempos prehispánicos, la cultura maya y la azteca manejaron cuerpos de agua para la producción de peces con el uso de chinampas en el centro del país y el aprovechamiento de cenotes en la península de Yucatán (Vega-Villasante y Cupul-Magaña, 2014). A finales del siglo XIX y hasta mediados del XX, estaba enfocada hacia el beneficio social, dirigida a la repoblación de cuerpos de agua dulce en zonas rurales, con tilapias, bagres y truchas (especies autóctonas e importadas) en el centro del país (Cupul-Magaña y Cifuentes-Lemus, 2016; Ibáñez *et al.*, 2011; Pedini Fernando-Criado, 1984). Durante la década de 1980, hubo un aumento continuo en la producción acuícola, sin embargo, de 1990 al 2000 la producción se detuvo y en algunos casos retrocedió, según la FAO (2019) debido a carencia de fondos para infraestructura.

Aunque esta actividad comenzó y se diversificó con especies de agua dulce, a finales de 1980 inicia la piscicultura marina con la engorda y estudios biológicos de especies de alto valor comercial, por ejemplo *Trachinotus paitiensis*, *Paralabrax maculatofasciatus*, *Lutjanus spp.*, *Totoaba macdonaldi* y *Epinephelus morio* (Avilés-Quevedo, 2000; Vega-Villasante y Cupul-Magaña, 2014), cabe mencionar que en 2015 y 2016 la mayor parte de la producción anual acuícola provino del mar (FAO, 2019). La piscicultura en mares mexicanos nace en 1997, con el cultivo de atún en Baja California, siendo hoy en día la primer industria a nivel nacional en cuanto a producción y estaciones de cultivo, seguida por el jurel (*Seriola spp.*), del cual, en el año 2000, el 64% de la captura nacional (2000 ton) se registró en la península de Baja California; en ese mismo año comenzó la engorda de alevines capturados, y fue hasta 2014 que se estableció la cría larvaria de *S. lalandi*, cubriendo las necesidades de semilla a la que se enfrenta la maricultura desde su

inicio en México (Avilés-Quevedo, 2000; Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004; Martínez-Matus, 2016).

1.2 El pez fuerte *Seriola rivoliana*

Reino: Animalia; Phylum: Chordata; Subphylum: Vertebrata; Clase: Actinopterygii; Orden: Perciformes; Familia: CARANGIDAE; Género: *Seriola*; Especie: *S. rivoliana* (Froese y Pauly, 2019).

Pez de cuerpo robusto, alargado, fusiforme y algo comprimido lateralmente, dorso color olivo oscuro y el vientre blanquecino; pedúnculo caudal con hendiduras arriba y debajo; dos aletas dorsales muy juntas, la primera corta y baja, con 7 radios duros, y la segunda larga, con 1 radio duro y 27 a 33 blandos; aletas pectorales más cortas que las pélvicas; línea lateral sencilla, sin escudetes; es pelágico y forma cardúmenes, que se distribuyen desde E.U.A. hasta el norte de Argentina; es una especie carnívora (Froese y Pauly, 2019; IctioTerm, 2013; Sinche-Chele *et al.*, 2009).

Actualmente, *S. rivoliana* está en el foco de productores e investigadores debido a su rápido crecimiento, su alto valor comercial, la tolerancia al confinamiento en jaulas flotantes y, a su aceptación de alimento seco (Burgoin-Cota, 2015; Grossi-Dopico, 2010; Quiñones-Arreola *et al.*, 2015; Roo *et al.*, 2010; Roo *et al.*, 2014), características que lo vuelven un producto factible para el cultivo, al igual que lo son *S. quinqueradiata* en Japón y Taiwan, *S. dumerili* en Japón, Arabia Saudita, Corea, el Mediterráneo y Vietnam, *S. lalandi* en Japón, Norte y Sur América, Australia y Hawaii, y *S. mazatlana* en Norte y Centro América (Sicuro y Luzzana, 2016; Symonds *et al.*, 2015). La importancia de este recurso como especie comercial ha promovido la investigación para optimizar su producción, recopilando información sobre su ciclo reproductivo, tasa de crecimiento, alimentación y patologías más frecuentes (Grossi-Dopico, 2010; Benítez-Hernández *et al.*, 2017; Quiñones-Arreola *et al.*, 2015; Medrano-Reyes, 2014; Reyes-Becerril *et al.*, 2017;

Roo, 2014; Smith-Vaniz, 2002). Este último punto es de suma importancia, debido a que la alta densidad de cultivo promueve la proliferación de parásitos (Fuentes-Z. *et al.*, 2009), entre ellos bacterias, virus y helmintos, u otros parásitos oportunistas que pueden afectar la producción (Balbuena-Rivarola *et al.*, 2011). Actualmente, los parásitos pertenecientes a la Clase Monogenea son un grave problema para el cultivo de peces, ya que por su baja especificidad, ciclo de vida directo (razón por la que se le atribuye el nombre), alta fecundidad y huevos fuertes, han disminuido considerablemente la producción de varias especies alrededor del mundo (Dinh-Hoai y Hutson, 2014; Flores-Crespo y Flores-Crespo, 2003; Trujillo-González *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2007). Bajo este contexto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una alternativa para el control de monogéneos pertenecientes al género *Neobenedenia*, usando como hospedero a peces de *S. rivoliana*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Indicadores de salud de peces

La seguridad alimentaria, aunada con temas éticos y económicos, es indispensable tanto para consumidores como productores, por ello y para estandarizar la calidad del producto, se propone el uso de índices de salud de los cultivos (Müller-Graf *et al.*, 2007). Los parámetros que se evalúan son clasificados de acuerdo al alojamiento, a la alimentación y al procesamiento de los peces (Peeler *et al.*, 2007; Villarroel, 2012), sin embargo, los valores de cada parámetro varían, ya que son adaptados al tipo de sistema utilizado para la producción y, debido a que cada especie tiene diferentes requerimientos en cuanto a capacidad de carga y tipo de alimentación. Para clasificar e identificar el bienestar animal en los cultivos acuícolas se realizan análisis de riesgo basados en indicadores operativos, los cuales ayudan a priorizar las medidas de manejo desde el inicio, ya sea engorda de juveniles capturados del medio natural o incluso desde la producción de larvas; estos pueden ser cualitativos, cuantitativos y/o semi-cuantitativos (Müller-Graf *et al.*, 2012). Particularmente, para determinar la salud de los peces, se deben observar características en el cultivo, por ejemplo la condición de aletas, las lesiones en la piel, la incidencia de erosión en aletas, la incidencia de deformaciones y de enfermedades, y el índice de mortalidad (Botreau *et al.*, 2007). La tabla I tomada del manual básico de sanidad piscícola propuesto por el Ministerio de agricultura y ganadería de la FAO (Balbuena-Rivarola *et al.*, 2011) muestra la comparación de los signos más notorios entre los peces sanos y enfermos.

Las enfermedades en los cultivos pueden ser de tipo no infecciosas (causadas por pH, mala calidad de agua, nutrición inadecuada, toxinas y daños mecánicos) o infecciosas (bacterias, virus, hongos e invertebrados).

Tabla I. Diferencias en el comportamiento y la apariencia física externa de un pez sano y de un enfermo. Tomada de Balbuena-Rivarola *et al.* (2011).

Aspecto a considerar	Pez sano	Pez enfermo
1. Natación	Normal (característico de cada especie)	Irregular, errático, puede ser dando giros, con hundimiento de costado en la superficie
2. Consumo de alimento	Voracidad característica de la especie. Sea en superficie o en fondo, con actividad estimulada en los horarios de rutina de alimentación	No consume alimento o queda volumen importante de alimento no consumido
3. Reacción de fuga	Responde a ruidos y estímulos	No responde a los ruidos al acercarnos al estanque
4. Coloración	Pigmentación definida de acuerdo con la especie	Colores claros en caso de anemias, falta de oxígeno y oscurecimiento en algunas enfermedades infecciosas
5. Piel	Suave, sin descamación ni hematomas, con secreción de mucus	Petequias (puntos hemáticos), descamaciones evidentes; úlceras o hematomas con hiper-secreción de mucus
6. Ojos	Brillantes con cornea transparente	Opacos
7. Branquias	Con una coloración rojo brillante y con lamelas completas	Coloración rosa pálido, cianótica, hemorrágicas, con lamelas discontinuas, con lesiones o con presencia evidente de parásitos
8. Aletas	Integras, sin hemorragias subcutáneas, ni presencia de parásitos	Con heridas y/o lesiones aparentes, con presencia de parasites adheridos
9. Ano y papilas genitales	No deben presentar hemorragias ni estar congestionadas	Salientes con signos de hemorragias

Específicamente, en las jaulas de engorda para peces marinos la mortalidad puede ser efecto de cuatro factores principales: 1) daños físicos a los peces por el mal manejo y el contacto con las redes, 2) altos niveles de contaminantes en el agua, 3) mala alimentación-nutrición y 4) enfermedades (Flores-Crespo y Flores-Crespo, 2003; Marchand *et al.*, 2012; Nakada, 2008).

2.2 Agentes parasitarios en piscicultura

A consecuencia del cultivo intensivo y las malas prácticas de manejo, frecuentemente se rompe el equilibrio entre patógeno-hospedero, ocasionando la aparición de enfermedades infecciosas y parasitarias (infestaciones), las cuales reducen el crecimiento, la tasa de fertilidad, y por ende la producción, pues también aumenta la mortalidad en los sistemas (Scholz, 1999; Timi y Mackenzie, 2015).

Los tipos de parásitos se distinguen según su relación con el hospedero; en cuanto a la prevalencia se clasifican en parásitos temporales (que sólo viven en el pez para alimentarse) y los permanentes; y dependiendo de la región del pez en la que se resguardan podremos llamarlos endoparásitos, es decir que viven en el interior como es el caso del virus causante de la viremia primaveral de la carpa (SVC) (Ahne *et al.*, 2002), las bacterias del género *Streptococcus* (Mishra *et al.*, 2018), e incluso helmintos, entre los que podemos encontrar especies que afectan a la salud pública, técnicamente llamados zoonóticos (Murugami *et al.*, 2018; Khalil *et al.*, 2014); o bien, ectoparásitos a los que se localizan en la superficie del hospedero, por ejemplo pequeños crustáceos, protozoos, y también helmintos (Balbuena-Rivarola *et al.*, 2014) cuyas infestaciones provocan pérdidas considerables a nivel mundial (Flores-Crespo y Flores-Crespo, 2003). Particularmente, los monogéneos afectan cultivos alrededor del mundo, mayormente en aguas tropicales y subtropicales, sin embargo, se han encontrado en las aguas templadas en Europa.

2.3 Infestaciones de *Neobenedenia* sp.

Los monogéneos ectoparásitos representan un peligro para la piscicultura, ya que infectan una amplia gama de cultivos, tanto en agua dulce como marina, debido a esto se han desarrollado y evaluado varias estrategias que contrarresten las pérdidas ocasionadas por estas infestaciones (Benavides-González *et al.*, 2014; De Lima Boijink *et al.*, 2015; De Oliveira *et al.* 2016; Ekanem y Brisibe, 2010; Hutson *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2011).

Particularmente *Neobenedenia spp.*, un complejo de monogéneos de la familia Capsalidae, ha representado un grave problema para los acuicultores a nivel mundial, ya que sujetándose a la piel del hospedero se alimenta del mucus y las células epiteliales, promoviendo la pérdida de sangre, falta de apetito, debilitamiento y hasta la muerte del hospedero (Hirazawa *et al.*, 2016; Wittington, 2004).

2.4 Manejo y control de infestaciones parasitarias

Los métodos de control utilizados en infestaciones por ectoparásitos, consisten en baños con agua dulce o en soluciones de diferentes solventes, sin embargo son laboriosos y, generan estrés en los peces el cual también aumenta la mortalidad en el cultivo (Flores-Crespo y Flores-Crespo, 2003; Fuentes-Z. *et al.*, 2009; Williams, 2009). Una alternativa para controlar las infestaciones causadas por *Neobenedenia sp.* es la administración de tratamientos farmacéuticos como el uso de praziquantel (PZQ) (Hirazawa *et al.*, 2013; Morales-Serna *et al.*, 2018; Williams, 2009). Williams *et al.* (2007) usaron dicho fármaco en el control de *Benedenia seriola* (Monogenea) en cultivos de *S. lalandi* y compararon dos vías de administración, obteniendo mejores resultados con la cánula gástrica, que con el uso de alimento seco recubierto con el fármaco. Los investigadores concluyeron que el PZQ modifica el sabor del alimento, volviéndolo poco atractivo al paladar de los peces, mismo resultado obtenido por Forwood *et al.* (2013) al querer controlar

a *Lepidotrema bidyana* en cultivos de *Bidyanus bidyanus*, un pez de agua dulce. Particularmente, el PZQ se enfrenta a varias barreras para llegar y actuar de manera eficiente en la piel o mucus de los peces; en primer lugar, su naturaleza lipofílica dificulta su administración; así como la dinámica del agua, desde el punto de vista ecológico puede causar estragos a fauna no infecciosa; considerando su farmacocinética, es absorbido a nivel estomago en un 80% y degradado en su mayoría por reacciones del metabolismo de fase I (Le, 2017; Tubbs y Tingle, 2006), no se debe dejar de lado el carácter organoléptico que confiere este fármaco, lo cual vuelve su administración vía oral, si no obsoleta, sí ineficiente para el suministro de PZQ en el control del parásito en cuestión en cultivos en mar abierto. Por lo anterior explicado, es interesante encontrar la manera de suministrar sustancias en peces de cultivo por vía oral, con métodos que reduzcan el estrés y anulen el tiempo de manipulación (Williams, 2009), para así controlar infestaciones provocadas por monogéneos que afectan la producción, sin dañar el ambiente en el que se desarrollan.

2.5 Uso de la nanotecnología en parasitología veterinaria y médica

En su revisión sobre el progreso del uso de la nanotecnología, Shaalan *et al.* (2016), definen a la nanotecnología como el estudio de la producción y aprovechamiento de partículas nanométricas. Recientemente, el estudio sobre las nanopartículas como sistemas transportadores, protectores y liberadores de sustancias activas, ha ido en aumento dentro de los campos de la industria farmacéutica y la biomedicina (Ping *et al.*, 2016; Rivas-Aravena *et al.*, 2015), ya que confieren al fármaco, o cualquier sustancia que se desee suministrar (i.e. insecticida, antioxidante, plásmido, antibiótico, fungicida), la capacidad de llegar al objetivo sin sufrir pérdida de efectividad, ya sea por labilidad, dosis inadecuada, desnaturalización de moléculas, incompatibilidad con el medio y, demás problemas que presentan los vehículos de mayor tamaño, cabe señalar que las

partículas que oscilan entre 120 y 200nm rara vez se someten a la eliminación en la sangre por el sistema retículo-endotelial, es decir, evitan las filtraciones de hígado y bazo (Das y Chaudhury, 2011; Ribeiro de Souza *et al.*, 2012; Shaalan *et al.*, 2016).

La nanotecnología otorga nuevas soluciones a problemas del pasado, aplicada en el diagnóstico, terapia animal, producción de vacunas, desinfectantes, promotores de reproducción e incluso en nutrición animal. El reemplazo del uso de métodos convencionales con el uso de nanopartículas se ha reflejado directamente en la salud pública, pues reduce los problemas de resistencia a antibióticos por lo que se administra menor cantidad de fármacos, lo que se traduce en menor cantidad de residuos en leche y carne, y por consecuencia un alto impacto económico (El-Sayed y Kamel, 2018).

2.6 Nanopartículas lipídicas

La técnica más accesible y menos invasiva para el suministro de fármacos es la vía oral. Sin embargo las limitantes para aplicar fármacos lipofílicos, como es el caso del PZQ, son varias incluyendo baja estabilidad en el medio gastrointestinal, poca permeabilidad transmembranal y metabolismo rápido. Por ello, es necesario encontrar matrices que faciliten el transporte de este tipo de activos para aprovecharlos de manera eficiente (Das y Chaudhury, 2011; Kolenyak dos Santos, 2014; Talegaonkar y Bhattacharyya, 2019). El tipo de nanopartículas utilizadas depende principalmente de la naturaleza química de la sustancia a encapsular. En el caso particular del PZQ, por ser de carácter lipofílico, conviene formular nanopartículas que puedan incorporar moléculas no polares y, a su vez estar provistas de una superficie que interactúe con el medio polar al que se pretende suministrar.

Desde hace tres décadas, se han utilizado distintos tipos de matrices y métodos para fabricar vehículos que permitan la administración de fármacos hidrofóbicos,

entre los que podemos mencionar a las nanopartículas poliméricas, las micelas y los liposomas; sin embargo, estos sistemas coloidales están asociados a desventajas como: su limitada estabilidad física, agregación, baja retención del fármaco al almacenarse, presencia de residuos de disolventes orgánicos en el producto final y citotoxicidad (Talegaonkar y Bhattacharyya, 2019).

Recientemente, se ha estudiado y evaluado el uso de nanopartículas lipídicas como vehículos de sustancias hidrofóbicas, ya que están compuestas por productos de bajo costo, de fácil alcance y no tóxicos; además se utilizan técnicas simples para su fabricación, las cuales pueden ser llevadas fácilmente a escalas mayores de producción (Müller *et al.*, 2002; Ribeiro de Souza *et al.*, 2014; Talegaonkar y Bhattacharyya, 2019; Tamjidi *et al.*, 2013). Cabe mencionar que los lípidos pueden promover la absorción oral de los fármacos encapsulados mediante la captación linfática selectiva, lo que facilita el transporte sin pasar por el proceso digestivo (Gaba *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2014). Dependiendo de las interacciones que los componentes del sistema puedan tener, la estructura de los nanoportadores lipídicos se clasifica en tres tipos: 1) imperfecta, se refiere a la disposición de cristales imperfectos formados por la unión de cadenas del lípido sólido o la combinación de varios compuestos, ya sea de cadenas saturadas y/o insaturadas, dispuestos en una matriz irregular donde el fármaco se localiza; 2) amorfa, que pueden ser formadas por la mezcla de lípidos sólidos con lípidos especiales como el isopropilmiristato; se trata de partículas con una matriz no cristalizada, pero que es estable y capaz de retener a los fármacos por mayor tiempo que las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS); y por último tenemos la estructura múltiple, formada cuando el bioactivo es solubilizado en el lípido líquido y al ser mezclado con el lípido sólido se forman gotas dentro de una matriz sólida al momento de reducir la temperatura a la del ambiente (Fang *et al.*, 2013; Tamjidi *et al.*, 2013).

2.7 Praziquantel incorporado a nanopartículas

Aunque no haya reportes del uso de nanopartículas cargadas con PZQ para el control de enfermedades en peces, Ribeiro de Souza *et al.* (2012) lo incorporaron a NLS de ácido esteárico con el fin de mejorar el tratamiento contra la esquistosomiasis. Ellas obtuvieron formulaciones estables a temperatura ambiente mediante el proceso de microemulsión (O/W), utilizando un homogenizador de alto cizallamiento. En otro estudio, Ribeiro de Souza *et al.* (2014) evaluaron la permeabilidad intestinal, la toxicidad en HepG2 y el efecto *in vitro* de NLS cargadas de PZQ en cultivos de *Schistosoma mansoni*, donde observaron que el uso de NLS funciona como reservorio, ya que encontraron una menor cantidad de fármaco absorbido en el intestino, en comparación con el tratamiento de PZQ libre. También, obtuvieron resultados favorables de toxicidad y del efecto antihelmíntico utilizando dosis de 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mencionan los autores que el uso de NLS es una estrategia efectiva para el tratamiento vía oral de la esquistosomiasis. De igual manera, Mishra *et al.* (2014) estudiaron la distribución linfática, a través del intestino, de una formulación de PZQ dentro de una matriz de tripalmitrina. La formulación fue fabricada por homogenización con ayuda de un homogenizador de alto cizallamiento, seguido de un proceso de ultrasonificación; comparada con una suspensión de fármaco libre, las nanopartículas presentaron valores mayores en cuanto a vida media, tiempo de concentración máxima y tiempo medio de permanencia en el hospedero.

A pesar de las ventajas que las NLS presentan como sistema de entrega vía oral, el porcentaje de encapsulación y tiempo de retención dentro de la nanopartícula se podrían mejorar. Varios investigadores han propuesto el uso de portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) como una opción viable para atender dichas limitaciones, ya que al combinar en su matriz a lípidos sólidos y líquidos, promueven la formación de compartimentos otorgando mayor espacio para incorporar sustancias activas (Aditya *et al.*, 2014; Kolenyak dos Santos, 2014;

Kolenyak dos Santos, 2011; Kolenyak dos Santos *et al.*, 2014; Mitri *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2002; Ribeiro de Souza *et al.*, 2012; Tamjidi *et al.*, 2013; Zheng, 2013). Particularmente, Kolenyak dos Santos (2014, 2011) incorporó al PZQ en NLC, utilizando las técnicas de homogenización de alto cizallamiento y ultrasonificación. Se propone en el presente trabajo una formulación de NLC-PZQ, que recubra al fármaco y lo dirija a la piel para cumplir su función antiparasitaria en peces de *S. rivoliana* como alternativa para controlar las infestaciones por *Neobenedenia sp.*

3. HIPÓTESIS

3.1 Pregunta científica

¿Serán las NLS un vehículo adecuado para la administración de activos destinados al control de infestaciones de *Neobenedenia sp.* en granjas de cultivo de jurel *Seriola rivoliana*?

3.2 Hipótesis

Considerando que el Praziquantel ejerce una fuerte actividad antiparasitaria contra *Neobenedenia sp.*, pero que este compuesto genera alteraciones organolépticas al alimento al grado que peces infestados con el parásito rechazan por completo el alimento medicado con Praziquantel, luego entonces su incorporación en nanopartículas lipídicas de fase sólida, resultaría en una alternativa efectiva para la medicación de peces infestados por *Neobenedenia sp.* vía oral a través del alimento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Incorporar praziquantel a nanopartículas lipídicas sólidas, y administrarlas vía oral para usarlas como control de infestaciones por *Neobenedenia sp.* en cultivos de *Seriola rivoliana*.

4.2 Objetivos particulares

1. Desarrollar una formulación de praziquantel en nanoportadores lipídicos, y evaluar sus propiedades fisicoquímicas.
2. Evaluar la aceptación de las nanopartículas con praziquantel, incorporadas a un alimento, por parte de *S. rivoliana*.
3. Analizar *in vitro* la actividad antihelmíntica de los NLC cargados con PZQ contra *Neobenedenia sp.*

5. JUSTIFICACIÓN

5.1 Importancia Científica

Considerando el potencial de la aplicación de sistemas nanoparticulados en el campo de la medicina y la veterinaria, esta investigación aportará conocimientos básicos sobre la administración de fármacos vía oral en cultivos marinos. La cinética de liberación en *S. rivoliana* también será un aporte para la ciencia básica.

5.2 Importancia Tecnológica

Se está proponiendo una formulación eficiente en el suministro de un fármaco a medios de cultivo de peces marinos, con las bondades que los nanoportadores lipídicos pueden ofrecernos, como ser biodegradable y, proteger y dirigir la sustancia activa hasta llegar a su destino funcional.

5.3 Importancia para el Desarrollo

5.3.1 Pertinencia Económica

Mejoraría la producción de *S. rivoliana*, pez de alto valor en el mercado oriental. Además de disminuir costos en tratamiento, ya que los nanoportadores lipídicos además de proteger al fármaco lo liberan sostenidamente, lo que disminuiría la dosis de administración.

5.3.2 Pertinencia Ambiental

Por ser biodegradables los portadores lipídicos no dejarían rastro en el medio marino, pues los lípidos serán tomados como alimentos ordinarios a la hora de la digestión.

5.3.3 Pertinencia Social

Se está proponiendo un vehículo con potencial eficiencia en el combate contra el parásito de *S. rivoiana*, además el praziquantel es usado en la medicina lo que aportará por otro lado un avance al suministro de fármacos al cuerpo humano.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Incorporación de Praziquantel a nanoportadores lipídicos

Para formular las nanopartículas cargadas de praziquantel, se siguió la metodología desarrollada por Kolenyak-Santos (2011). Brevemente, la suspensión acuosa de las nanopartículas se elaboró por la técnica de sonicación; se utilizó ácido esteárico, aceite de hígado de bacalao y praziquantel (PZQ) para formar el esqueleto lipídico de los nanoportadores, mientras que a la fase acuosa se agregó una mezcla de polisorbato-20 y Brij-C10. La fase lipídica fue calentada hasta 75 °C, mientras que la mezcla de tensoactivos fue disuelta en agua purificada a una temperatura similar que los lípidos. Posteriormente, la fase acuosa fue agregada a la fase lipídica en agitación para formar una pre-emulsión, misma que fue sometida a un proceso de sonicación durante 20 minutos.

6.2 Formulación del nanoportador

La matriz lipídica fue compuesta de ácido esteárico, dando rigidez, y aceite de hígado de bacalao como formador de compartimentos dentro de la nanopartícula, como fase dispersante se utilizó una mezcla de tensoactivos disueltos en agua mili-Q. La fabricación del nanoportador se llevó a cabo en dos fases, se evaluaron cuatro proporciones del sistema lipídico y dos concentraciones de tensoactivo. La tabla II muestra las formulaciones analizadas. Cabe mencionar que las formulaciones se sometieron a una prueba de estabilidad acelerada por medio de centrifugación (5000 rpm durante 10 minutos).

Tabla II. Formulaciones de nanoportadores para determinar la proporción de aceite de ácido esteárico¹ e hígado de bacalao² en la fase lipídica.

FORMULACIÓN	FASE LIPÍDICA		TENSOACTIVO (P80, %)
	AE ¹ (%)	AHB ² (%)	
F1	80	20	5
F2	60	40	5
F3	40	60	5
F4	20	80	5
F5	80	20	1
F6	60	40	1
F7	40	60	1
F8	20	80	1

Con el fin de encontrar el balance hidrofílico-lipofílico (HLB), para optimizar la estabilidad de los NLC, se realizaron formulaciones con diferentes sistemas de tensoactivos, usando la proporción AE:AHB de 4:6.

El HLB se calculó con la ecuación de Griffin:

$$HLB = HLB_A * f_A + HLB_B * f_B(1)$$

Donde: HLB es el balance hidrofílico-lipofílico del sistema, **HLB_A** y **HLB_B** son los valores de HLB para cada tensoactivo, **f_A** y **f_B** son las proporciones de cada tensoactivo en el sistema.

Tabla III. Sistemas de tensoactivos evaluados en la producción de NLC.

Formulación	Brij-C10	Polisorbato-20	Concentración (%)
E1	50	50	2.5
E2	0	100	2.5
E3	100	0	5
E4	70	30	2.5
E5	70	30	1
E6	100	0	1
E7	30	70	5

Después de una prueba acelerada de estabilidad por centrifugación (1000rpm/5min), se incorporó PZQ (9%, w/w) a E4, E5 y E6.

6.3 Caracterización fisicoquímica de los nanoportadores

- Tamaño de partícula y potencial Z

Para evaluar la estabilidad física de la formulación conforme al tiempo. Se midió semanalmente el diámetro de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z (PZ), con la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) usando un Malvern® Nanosizer ZS.

- Microscopía electrónica de barrido

Para conocer la morfología de las partículas y del fármaco, se observaron muestras de NLC, PZQ-NLC y PZQ a través de microscopía electrónica de barrido. Las muestras fueron recubiertas con carbono previo al análisis.

- Eficiencia de encapsulación (EE%)

Para cuantificar por espectrofotometría la cantidad de PZQ fuera de los nanoportadores, la solución de PZQ-NLC fue sometida a centrifugación (3000rpm/3min) dentro de filtros Amicon, el sobrenadante (fármaco no encapsulado) fue diluido en etanol.

- Cuantificación de praziquantel por espectrofotometría UV-Vis

El método UV-Vis fue validado de acuerdo al Consejo Internacional de Armonización(ICH) de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano y la guía para validación de Métodos Bioanalíticos y Analíticos (RDC 899) de la Agencia Nacional Brasileña de Vigilancia Sanitaria (ANVISA). El método de cuantificación de PZQ fue desarrollado con el espectrofotómetro Agilent® Cary 60, determinando los parámetros de: linealidad, exactitud, precisión, robustez, límite de detección y límite de cuantificación.

La linealidad se obtuvo con soluciones de PZQ entre 0.1 y 0.8 mg mL⁻¹ a λ_{\max} =264nm. El parámetro se evaluó por triplicado. La precisión y repetitividad fueron verificadas analizando tres concentraciones diferentes (0.1, 0.4 and 0.8mg

mL⁻¹) por triplicado a través de días, lecturas y analista. La exactitud también se determinó en las concentraciones mencionadas, por triplicado. Los límites de detección y cuantificación se alcanzaron disminuyendo la concentración de PZQ al menor nivel detectado (0.1, 0.08 y 0.06 mg mL⁻¹) y calculando el error estándar y la pendiente de la curva de calibración usando la ecuación de regresión lineal. La robustez fue verificada durante el análisis de una solución de PZQ a 0.4 mg mL⁻¹, la cual se expuso a dos tipos de luz (amarilla y blanca), diferentes temperaturas (25 y 4 °C) y leída a las 0 y 24 h después de su preparación.

6.4 Preparación del alimento medicado

La fabricación de alimento medicado se llevó a cabo en la planta de producción de alimento del CIBNOR, se utilizó alimento comercial Skretting®, alginato de sodio como aglutinante, y las diferentes formulaciones de praziquantel a comparar. La tabla IV muestra los porcentajes utilizados en cada uno de los alimentos utilizados en el ensayo.

Tabla IV. Formulaciones de alimento medicado con praziquantel.

	PZQ libre (%)	PZQ Encapsulado (%)	Control (%)
Alimento Skretting	96.50	41.44	97.00
Alginato de sodio	3.00	3.00	3.00
PZQ	0.50	0.00	0.00
NLC con PZQ	0.00	55.56	0.00
NLC sin PZQ	0.00	0.00	0.00
TOTAL	100.00	100.00	100.00

6.5 Condiciones ambientales

Los peces utilizados para los ensayos fueron cultivados en tanques de aproximadamente 1000 L, con un flujo de recambio de 100%/24h, a una temperatura promedio de 25°C.

El experimento de actividad antihelmíntica *in vitro* con los alimentos fabricados se mantuvo a una temperatura promedio de 25°C, en agua de mar.

6.6 Bioensayo de aceptación del alimento medicado por *Seriola rivoliana*

Para observar la aceptación al alimento medicado con PZQ, se suministró a jureles y robalos la cantidad necesaria para alcanzar la dosis de 50mg Kg⁻¹. El ensayo duró cuatro semanas (4 fases dependiendo el tipo del alimento que se les administró). Durante 7 días se alimentó a los peces con alimento control, posteriormente, comenzó la fase de desensibilización al portador, asperjando partículas sin praziquantel al alimento control, una vez confirmado que los peces se alimentaban sin problemas, se pasó a la medicación, primeramente con PZQ libre en el alimento y, la siguiente semana suministrando el alimento mezclado con la formulación de nanopartículas. Los peces fueron grabados con una cámara subacuática mientras se les arrojaba el alimento para observar su comportamiento, en ambas especies se pudo lograr que los peces comieran del alimento con E4P, sin embargo, no vimos diferencia en la ingesta con el fármaco libre.

6.7 Actividad antihelmíntica del alimento cargado con praziquantel encapsulado

Para probar la actividad de los portadores cargados con praziquantel, se realizó un ensayo *in vitro* colocando monogéneos del género *Neobenedenia* en pocillos

con agua marina, los tratamientos analizados fueron: PZQ libre, los alimentos fabricados para los ensayos de aceptación por el pez, y un control con agua marina. Se hicieron observaciones cada hora durante 6 horas y una observación más a las 18 h. Se utilizaron parámetros como producción de huevos, comportamiento del individuo, adhesión a la superficie, y muerte. Se utilizaron 6 pocillos por tratamiento. Cabe mencionar que se realizó un análisis estadístico para identificar la existencia de diferencias en cuanto a la producción de huevos en cada tratamiento.

6.8 Colecta de parásitos

Los adultos de *Neobenedenia* sp. fueron extraídos de peces (*S. rivoliana*) infestados, utilizando la técnica de “raspado” de piel. Antes de comenzar el raspado los peces fueron sedados con un baño de eugenol (0.125 mL/L) para facilitar la manipulación mientras se obtenían los monogéneos. El raspado se realizó con aguja y espátula, para después colocar a los individuos en placas de 6 pocillos (2 parásitos/pocillo).

6.9 Análisis estadístico

Para verificar la normalidad del conjunto de datos se realizó una prueba Shapiro-Wilk. Posteriormente, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para saber si existían diferencias significativas entre al menos uno de los tratamientos analizados. Finalmente, se corrió la prueba de Wilcoxon, que compró a cada uno de los tratamientos y determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Se tomó en cuenta un $\alpha=0.05$ en cada análisis. Los análisis estadísticos se desarrollaron en R.

7. RESULTADOS

7.1 Formulación de los nanoportadores lipídicos

Después de la prueba de estabilidad acelerada F5, F6 y F7 fueron descartadas (Tabla II). El tamaño promedio de las partículas con 5% de tensoactivo varió entre los 120 y 400nm, el cual incrementó directamente a la proporción de ácido esteárico en la formulación. F8 (1% de P80) presentó un diámetro de partícula de 200nm. El Pdl varió de acuerdo a la proporción AE:AHB entre las formulaciones con 5 % de P80 (0.250 - 0.650), F1 presentó el mejor resultado, no obstante, F8 mostró un Pdl estable (~ 0.250) en un lapso de 5 semanas. La Fig. 1 muestra el comportamiento del tamaño de las formulaciones analizadas, y los Pdl determinados.

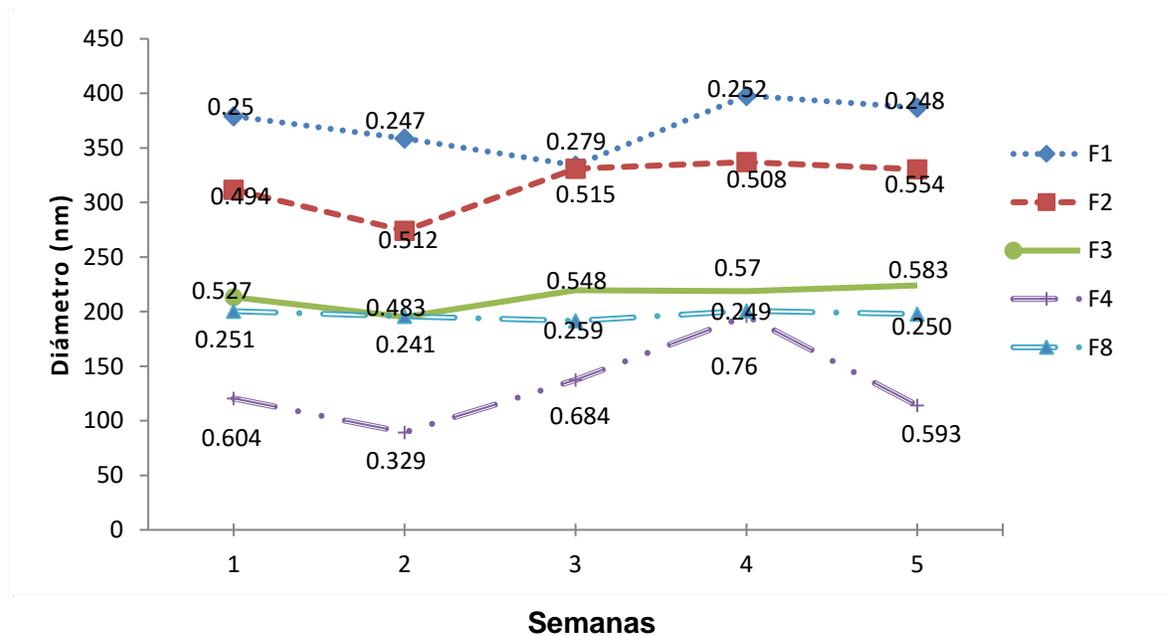


Figura 1. Evolución del tamaño de los nanoportadores con respecto al tiempo (los números en las marcas indican el valor de Pdl).

7.1.1 Determinación del sistema de tensoactivos

Los valores de HLB resultantes de las mezclas de tensoactivos se muestran en la tabla V donde se pueden observar valores de 12 a 16.7.

Tabla V. Valores de HLB resultantes de los sistemas de tensoactivos empleados para preparar las formulaciones de PZQ incorporado a NLC.

Experimento	Formulación	HLB
E1	4:6_C10 ₅₀ :P20 ₅₀ [2.5]	14.35
E2	4:6_P20[2.5]	16.7
E3	4:6_C10[5]	12
E4	4:6_C10 ₇₀ :P20 ₃₀ [2.5]	13.41
E5	4:6_C10 ₇₀ :P20 ₃₀ [1]	13.41
E6	4:6_C10 ₁₀₀ [1]	12
E7	4:6_C10 ₃₀ :P20 ₇₀ [5]	15.29

* Nomenclatura: F_T1%:T2%[tensoactivo w/w]

C10 = Brij C10

T20 = Polisorbato-20

Después de la incorporación de PZQ a E4, E5 y E6, sólo E4 presentó estabilidad. A partir de aquí se referirá como la formulación E4P a las formulaciones con praziquantel incorporado.

7.1.2 Caracterización fisicoquímica

- Estabilidad

La formulación E4P se mantuvo estable durante al menos 2 meses, presentando un tamaño de partícula de 200nm de diámetro, el índice de polidispersidad de 0.27 \pm 0.02 con un potencial Z de -30 \pm 2 mV.

- Microscopía electrónica de barrido

Los NLC resultantes presentan una forma de esférica a ovoide, además se obtuvo una medición de partícula mayor a la arrojada por DLS. La figura 2 muestra una fotografía del análisis.

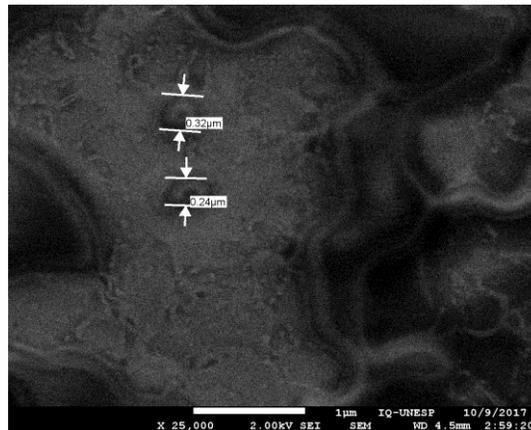


Figura 2. Fotografía de nanopartículas cargadas con praziquantel por microscopía electrónica de barrido. Mostrando la morfología ovoide de los nanoportadores.

- Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

La Fig. 3 muestra los espectros de absorción en infrarrojo de PZQ, E4 y E4P, donde se observan bandas interesantes cercanas a 700, 1100, 1400 y 1600 ondas cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales de la molécula del fármaco los cuales se ocultan en las formulaciones de nanoportadores lipídicos.

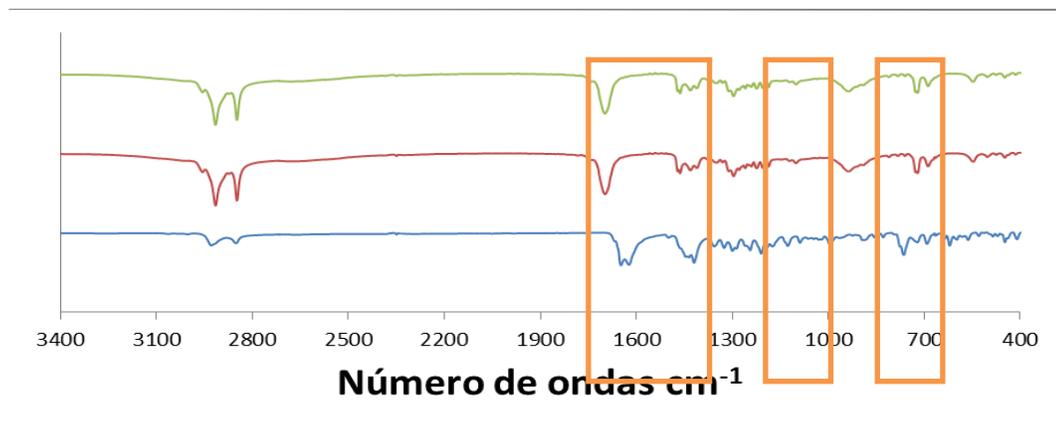


Figura 3. Espectros de FT-IR para praziquantel (azul), E4 (rojo) y E4P (verde).

- Eficiencia de encapsulación (EE%)

La longitud de onda utilizada en el método de cuantificación por espectrofotometría UV-Vis validado (sección de métodos) fue de 264nm. La eficiencia de encapsulación de E4P alcanzó un 85 ± 1 %.

7.2 Bioensayos de aceptación al alimento medicado

Los porcentajes de humedad iniciales de los alimentos fabricados se encuentran en la Tabla VI, cabe señalar que el alimento control fue roseado con E4 para tener un cuarto tratamiento (blanco), los cuatro alimentos fabricados se hundieron en el agua.

Tabla VI. Porcentaje de humedad de los alimentos fabricados para el ensayo de palatabilidad.

Alimento	Humedad (%)
Control	4.3
Praziquantel libre	5.5
Nanoportadores con PZQ	7.6

Se fabricó alimento “pelletizado” con un diámetro de 4mm y cortado en trozos de 10mm cada uno para asegurar que los peces fueran capaces de ingerirlo sin problemas.

7.2.1 Palatabilidad

La alimentación con PZQ encapsulado a jureles resultó satisfactoria, logrando que los 20 peces alimentados ingirieran sin problemas los “pellets”, alcanzando la cantidad necesaria para administrar una dosis de 50mg kg^{-1} . En el caso de los robalos, debido a su comportamiento alimenticio no fue posible observar que los 10 peces en el tanque buscaran el alimento, sin embargo, los que buscaron el alimento lo ingirieron sin problema alguno.

7.3 Actividad antihelmíntica de los alimentos medicados

Los monogéneos tratados con PZQ en cualquier modalidad se desprendieron de las placas en menos de una hora, a diferencia de los tratamientos en los que sólo se empleó alimento control y alimento con E4. Cabe señalar que los monogéneos tratados con PZQ, ya sea encapsulado o libre, continuaron dando señales de vida como espasmos y contracciones leves durante 6h, sin embargo se contaron como muertos pues ya no habría posibilidad de seguirse alimentando del mucus en una situación natural, lo que conllevaría a la muerte. Un punto importante es la producción de huevos durante el experimento (Fig. 4), la cual disminuyó en los tratamientos con fármaco, mientras que los organismos con los tratamientos control y blanco siguieron produciendo huevos, al menos durante 18h de observación.

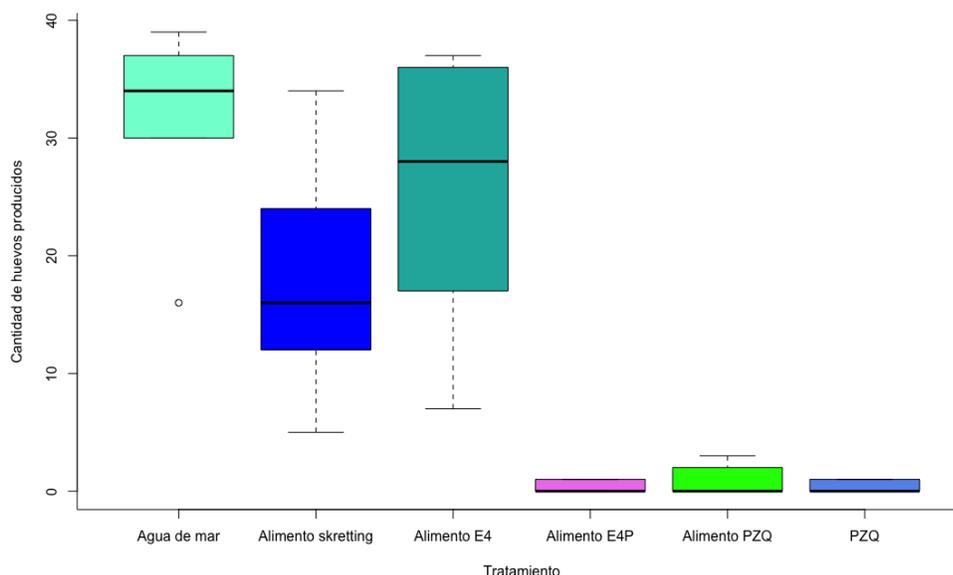


Figura 4. Producción de huevos de *Neobenedenia sp.* a 18 h del ensayo de actividad antihelmíntica con alimentos medicados.

El conjunto de datos los tratamientos no presentaron una distribución normal, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, por la cual se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p=2.707e-$

05).Lo anterior, quiere decir que existe una influencia de los tratamientos en cuanto a la producción de huevos, la prueba de Wilcoxon nos mostró que existe diferencia entre los tratamientos con PZQ (libre, incorporado al alimento, encapsulado) y los que no contenían al fármaco en ninguna de las presentaciones ($p=0.0072$). También se determinó que no existe diferencia significativa entre el tratamiento de alimento con E4P comparado con el PZQ incorporado al alimento ($p=0.8298$), ni con el tratamiento de fármaco disuelto en el agua ($p=1.000$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Formulación de Praziquantel encapsulado en nanoportadores lipídicos

En cuanto a la formulación de nanoportadores, el aceite de hígado de bacalao proporcionó un medio que disuelve al fármaco para la formación de gotas en compartimentos; además contribuyó con un sabor que mejora la palatabilidad del sistema, punto importante en el uso de NLC como vehículo del PZQ. Las proporciones de lípidos en el sistema determinaron la estructura del portador (Kolenyak-Santos *et al.*, 2014), característica que favoreció la disposición del activo incorporado, es decir al usar una proporción 4:6 de AE:AHB aseguramos que la mayoría del aceite esté inmerso en una matriz sólida de ácido esteárico, si bien pudimos haber una concentración menor de aceite, nuestro objetivo es esconder al fármaco, sumando la razón de que en las pruebas de estabilidad dicha proporción fue la más favorable para nuestro sistema. De los tres tipos de estructura propuestos en la literatura, el sistema formulado presenta una matriz de estructura múltiple, pues el fármaco fue disuelto en el aceite *a priori* la agregación del ácido esteárico. El espectro de FT-IR corroboró que el fármaco se encontraba dentro de los portadores, pues comparando nuestros resultados con los de Kolenyak-Santos (2011) observamos cómo las bandas correspondientes a los enlaces del PZQ (1639.60; 1492.84; 1438.26 cm^{-1} asignada para anillos aromáticos, la señal en 1126.86 cm^{-1} la cual se asigna a los enlaces C-N y, otra señal en 767.11 cm^{-1} correspondiente al grupo piranozin) no estaban en las muestras de E4P analizadas, en comparación con la muestra de PZQ (Fig. 3). Por lo anterior, se determina que el fármaco está inmerso en gotas de aceite rodeadas por una corteza sólida de ácido esteárico. El diámetro de las partículas en el sistema (~200nm) fue favorable para el transporte pasivo hacia el sistema linfático, como lo mencionan Das y Chaudhury(2011), el cual promueve la entrada del fármaco en mayor proporción no metabolizada al torrente sanguíneo, logrando

disminuir la cantidad de PZQ suministrado al cultivo, reduciendo el costo para el control de parásitos helmínticos, pues el fármaco es eficiente no solo para ectoparásitos monogéneos, como lo reporta el equipo de la doctora Daflon Gremião al utilizar NLS y NLC para el control de la esquistosomiasis (Kolenyak-Santos *et al*, 2014; Ribeiro de Souza *et al.*, 2014). El diámetro de los NLC observados en el microscopio de barrido (Fig. 2) fue mayor que lo medido con la técnica de DLS, esto debido a que el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica involucra el secado de las mismas, lo cual al evaporar el medio dispersante en este caso el agua, promueve la agregación de las partículas, aun así el tamaño solo aumentó 100 nm.

8.2 Aceptación de las nanopartículas con praziquantel por parte de *S. rivoliana*.

Aun obteniendo resultados favorables para controlar monogéneos en cultivos de *S. rivoliana* vía oral por medio del alimento, no se mostró rechazo al alimento que sólo contenía al fármaco mezclado en pellet, contrario a lo que reportan Forwood *et al.* (2013), los videos obtenidos a la hora de la alimentación mostraron cómo los jureles tragaban sin regurgitar el alimento, tanto de PZQ como el de E4P, esto podría deberse al comportamiento voraz que la especie muestra, no obstante el objetivo de esta investigación es proteger al fármaco para que llegue hasta la piel, suministrándolo en la menor cantidad posible para igualar la dosis propuesta en la literatura que es de $40\text{mgkg}^{-1}\text{PC}$ (Tubbs y Tingle, 2006), cabe señalar que en el laboratorio de parasitología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste ya se trabaja con dicho fármaco, utilizando una dosis de $50\text{mgkg}^{-1}\text{PC}$ y en la experiencia del equipo se ha observado el rechazo de capsulas envueltas en alimento. Por otro lado los robalos utilizados como control también fueron filmados, y efectivamente se comieron los trozos de alimento con E4P, sin embargo, el comportamiento de alimentación que mostraron era un tanto

jerárquico, es decir, primero comía uno y después le seguían los demás, dentro de lo poco que se pudo observar es que los pellets con PZQ tragados por los robalos fueron regurgitados, sin embargo, por el patrón de conducta descrito anteriormente no podría proponer el método de control para esta especie pues no sabríamos si realmente la mayoría del estanque comería la dosis necesaria para eliminar al parásito. Queda probar el alimento formulado en otras especies.

8.3 Actividad antihelmíntica *in vitro* de los NLC contra *Neobenedenia* sp.

Si bien es sabido que al desprenderse el parásito y ser incapaz de anclarse a otro hospedero, seguirá la muerte del monogéneo, es importante saber si existe la producción de huevos (Trasviña-Moreno *et al.*, 2017). La figura 4, muestra la producción de huevos durante el tiempo de observación del experimento, se observa en el gráfico que existe una excepción en el tratamiento del agua de mar, esto pudo haberse debido a la extracción de los monogéneos durante el raspado epitelial del pez. El análisis estadístico realizado en el experimento consistió de pruebas no paramétricas, pues al tener en su mayoría ceros, los datos de producción de huevos en los tratamientos con PZQ no pudieron ser corregidos o elevados para utilizarlos dentro de una distribución normal. Datos interesantes en el experimento es que al menos en la producción de huevos "post-desprendimiento de la placa", los tratamientos de alimento-E4P y PZQ libre no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se tiene un efecto similar en ambos tratamientos lo cual indica un resultado favorable para esta investigación. Esto entonces, apuesta al uso de nanopartículas lipídicas en el tratamiento de peces vía oral, reduciendo así el trabajo (mano de obra) y el estrés del cultivo, además, que al ser fabricadas por componentes de bajo costo, reduce considerablemente el costo de producción, por lo que aumenta las ganancias del acuicultor. Cabe señalar que la formulación desarrollada puede ser empleada en otros casos de infestaciones por helmintos, pues el PZQ es de amplio espectro,

incluso en ganadería, o en la medicina, pues como el equipo de la doctora DaflonGremião reporta, las nanopartículas lipídicas sólidas cargadas de PZQ mejoran el tratamiento contra la esquistosomiasis

9. CONCLUSIONES

El uso de la técnica de ultrasonificación para formular NLC cargados de PZQ resultó eficiente. Obteniendo partículas con un diámetro de 200nm en un sistema estable a temperatura de refrigeración durante al menos 6 meses.

El HLB requerido para la formulación de PZQ fue de 13.41, conseguido con la combinación de los tensoactivos Brij-C10 y Polisorbato-20 en una proporción de 70-30%, respectivamente.

Aunque el método de cuantificación por espectrofotometría UV-Vis fue desarrollado, es recomendable utilizar métodos más precisos para evaluar el porcentaje de encapsulación, por ejemplo, uso de HPLC.

Es posible la fabricación de alimento "pelletizado" sin perder las características del portador, pues las temperaturas utilizadas en el proceso no sobrepasan los 40°C, mientras que el ácido esteárico tiene un punto de fusión de 69.28°C.

El alimento con E4P es una alternativa potencial como control de *Neobenedenia* sp. en el experimento *in vitro*. Pues además de desprender a los parásitos de la superficie de contacto, redujo la producción de huevos, lo que propone una reducción en la segunda generación de adultos post tratamiento.

10. LITERATURA CITADA

- Aditya, N. P., A. S. Macedo, S. Doktorovova, E. B. Souto, S. Kim, P.-S. Chang, S. Ko. 2014. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT – Food Science and Technology*. 59:115-121.
- Ahne, W., H. V. Bjorklund, S. Essbauer, N. Fijan, G. Kurath, J. R. Winton. 2002. Spring viremia of carp (SVC). *Dis Aquat Organ*. 52(3):261-272.
- Avilés-Quevedo, A. 2000. Cultivo de Peces Marinos. Cap. XV. En: Álvarez-Torres, M. Ramírez-Flores, L. M. Torres-Rodríguez y A. Díaz de León-Corral (Eds). *Estado de Salud de la Acuicultura*, 2000. INP. pp 263-278.
- Avilés-Quevedo, A., F. Castelló-Orvay. 2004. Manual para el cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: CARANGIDAE) en Baja California Sur, México. Instituto Nacional de la Pesca, Dirección General de Investigación en Acuicultura. Primera edición. D. F., México. 47p.
- Banerjee, S., J. Pillai. 2019. Solid lipid matrix mediated nanoarchitectonics for improved oral bioavailability of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. DOI: 10.1080/17425255.2019.1621289.
- Balbuena-Rivarola, E. D., V. M. Ríos Morinigo, A. Flores-Nava, J. Meza, A. Galeano. 2011. Manual básico de sanidad piscícola. Ministerio de agricultura y ganadería – Viceministerio de ganadería (FAO). 51p.
- Benavides-González, F., R. Gómez-Flores, J. Sánchez-Martínez, J. Rábago-Castro, I. Montelongo-Alfaro. 2014. *In Vitro* and *In Vivo* Antiparasitic Efficacy of Praziquantel against Monogenean *Ligistilix flavidus* in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Thai J Vet Med*.44(4):533-539.
- Benítez-Hernández, A., S. L. P. Jiménez-Bárceñas, E. Y. Sánchez-Gutiérrez, J. C. Pérez-Urbiola, D. Tovar-Ramírez, E. Palacios, R. Civera-Cerecedo. 2017. Use of marine by-products meals in diets for juvenile longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. 2018. *Aquac Nutr*. 24:562-570.
- Borja, A. 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Bol Inst Esp Oceanogr*. 18(1-4):41-49.

Botreau, R., M. B. M. Bracke, P. Pery, A. Butterworth, J. Capdeville, C. G. Van Reenen, I. Veissier. 2007. Aggregation of measures to produce an overall assessment of animal welfare. Part 2: analysis of constraints. *Animal* 1(8):1188-1197.

Burgoin-Cota, M. 2015. Estudio de la incorporación de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* a través del rotífero *Brachionus rotundiformis* durante los primeros días de desarrollo del jurel *Seriola rivoliana*. Tesis (Maestría en uso, manejo y preservación de los recursos naturales). La Paz, B. C. S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 87p.

Cupul-Magaña, F. G., J. L. Cifuentes-Lemus. 2016. El primer libro formal de Piscicultura en México: Piscicultura de agua dulce de Esteban Cházari (1884). Acta Pesquera. Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara. 5p.

Das, S., A. Chaudhury. 2011. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid lipid matrix for oral drug delivery. *AAPS Pharm Sci Tech.* 12(1):62-76.

De Lima-Boijink, C., W. S. da Cunha-Miranda, E. Campos-Chagas, J. Koiji-Dairiki, L. A. K. Aori-Inoue. 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture.* 438:138-140.

De Oliveira, G. S., F. Marinho-Neto, M. L. Ruiz, M. Acchile, E. Campos-Chagas, F. C. Maia-Chaves, M. Laterça-Martins. 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture.* 450:182-186.

Dinh Hoai, T., K. S. Hutson. 2014. Reproductive Strategies of the Insidious Fish Ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). *PLoS ONE* 9(9): e108801.

Ekanem, A. P., E. A. Brisibe. 2010. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitol Res.* 106(5):1135-1139.

El-Sayed, A., M. Kamel. 2018. Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3913-y>.

Fang, C. L., S. A. Al-Suwayeh, J. Y. Fang. 2013. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Recent Pat Nanotech.* 7:41-55.

FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO. 2019. Visión general del sector acuícola nacional: México.

Flores-Crespo, J., R. Flores-Crespo. 2003. Monogéneos, parásitos de peces en México: estudio recapitulativo. *Tec Pecu Méx.* 41(2):175-192.

Fuentes-Z., J. L., I. Sprock, Y. Mago, O. L. Chinchilla. 2009. Monogéneos parásitos de peces de la Laguna Las Marites, Isla de Margarita, Venezuela. *Asociación Interciencia.* 34(7):507-513.

Forwood, J. M., L. O. Harris, M. R. Deveney. 2013. Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *J Fish Dis.* 36:939-947.

Froese, R., D. Pauly (eds). 2019. Fish Base. *Seriola rivoliana* Valenciennes, 1833. Acceso a través de World Register of Marine Species en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126818>

Gaba, B., M. Fazil, A. Ali, S. Baboota, J. K. Sahni, J. Ali. 2015. Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration. *Drug Delivery.* 22(6):691-700.

Grossi-Dopico, E. 2010. Primeras experiencias de cultivo larvario del medregal negro (*Seriola rivoliana*, Valenciennes 1833) en Canarias. Tesis (Master oficial en cultivos marinos). Las Palmas de Gran Canaria, España. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 151 p.

Hernández-Barraza, C. A, G. Aguirre-Guzmán, D. G. López Cantú. 2009. Sistemas de producción de acuicultura con recirculación de agua para la región norte, noreste y noroeste de México. *Revista mexicana de agronegocios.* 8(25):117-130.

Hirazawa, N., K. Akiyama, N. Umeda. 2013. Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedenia seriolae* and *Neobenedeniagirellae*. *Aquaculture.* 404-405:59-64.

Hirazawa, N., R. Ishizuka, H. Hagiwara. 2016. The effects of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection on host amberjack *Seriola durmelli* (Carangidae): Hematological and histopathological analyses. *Aquaculture.* 461:32-39.

Hutson, K. S., L. Mata, N. A. Paul, R. de Nys. 2012. Seaweed extract as a natural control against the monogenean ectoparasite, *Neobenedenia sp.*, infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). *Int J Parasitol.* 42(13-14):1135-1141.

Ibáñez, A. L., H. Espinosa-Pérez, J. L. García-Calderón. 2011. Datos recientes de la distribución de la siembra de especies exóticas como base de la producción pesquera en agua interiores mexicanas. *Rev Mex Biodiv.* 82(3):904-914.

Ictiobase. 2013. *Seriola rivoliana*. Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía. Consultado el 20 de octubre de 2018 en: http://www.ictiobase.es/nombre_cientifico.php?nc=268.

INAES. 2018. Acuicultura, historia y actualidad en México. Consultada el 14 de junio de 2019 en: <https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/acuicultura-historia-y-actualidad-en-mexico?idiom=es>.

Khalil, M. I., I. S. El-Shahawy, H. S. Abdelkader. 2014. Studies on some fish parasites of public health importance in the southern area of Saudi Arabia. *Braz J Parasitol.* 23(4):435-442.

Kolenyak dos Santos, F. 2011. Desenvolvimento e caracterização de carregadores lipídicos nanoestruturados contendo praziquantel. Tesis (Maestría). Araraquara, SP, Brasil. Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual Paulista. 81p.

Kolenyak dos Santos, F. 2014. Avaliação de sistemas lipídicos nanoestruturados utilizados como estratégia para melhorar as propriedades biofarmacéuticas do praziquantel no tratamento da esquistossomose. UNESP Tesis (Doctorado). Araraquara, SP, Brasil. Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual Paulista. 134p.

Kolenyak-Santos, F., C. Garnero, R. N. Oliveira, A. L. Ribeiro de Souza, M. Chorilli, S. M. Allegretti, M. R. Longhi, M. V. Chaud, M. P. Daflon-Gremião. 2014. Nanostructured lipid carrier as a strategy to improve the in vitro Schistosomiasis activity of praziquantel. *J Nanosci Nanotechnol.* 14:1-12.

Le, J. 2017. Metabolismo de los fármacos. Manual MSD: Versión para profesionales. Consultada el 10 de mayo de 2019 en: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/metabolismo-de-los-f%C3%A1rmacos>

Nakada, M. 2008. Capture-based aquaculture of yellowtail. In A. Lovatelli; P. F. Holthus (eds). Capture-based aquaculture. Global overview. FAO Fisheries technical Paper. Roma, FAO. 508:199-215.

Marchand, M. J., J. C. van Dyk, I. E. J. Barnhoorn, G. M. Wagennar. 2012. Histopathological changes in two potential indicator fish species from a hyper-

eutrophic freshwater ecosystem in South Africa: a baseline study. *Afr J Aquat Sci.* 37(1):39-48.

Martínez-Matus, E. 2016. Diversidad genética y éxito reproductivo del jurel de castilla *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) en cautiverio. Tesis (Maestría). Ensenada, B. C., México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 88p.

Martínez-Porchas, M., L. R. Martínez-Cordova. 2012. World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *Sci World J.* 2012:1-9. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/389623>

Medrano-Reyes, B. I. 2014. Evaluación del efecto de la temperatura en el crecimiento, digestibilidad y las enzimas digestivas de juveniles de jurel cola amarilla (*Seriola lalandi dorsalis*). Tesis (Maestría). Ensenada, B. C., México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 55p.

Mishra, A., G. H. Nam, J. A. Gim, H. E. Lee, A. Jo, H. S. Kim. 2018. Current challenges of streptococcus infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture. *Mol Cells.* 41(6):495-505.

Mishra, A., P. Rao-Vuddanda, S. Singh. 2014. Intestinal lymphatic delivery of praziquantel by solid lipid nanoparticles: Formulation design, *in vitro* and *in vivo* studies. *J nanotechnol.* 2014:1-12.

Mitri, K., R. Shegokar, S. Ghola, C. Anselmi, R. H. Müller. 2011. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm.* 414:267-275.

Morales-Serna, F. N., M. Chapa-López, J. M. Martínez-Brown, L. Ibarra-Castro, R. M. Medina- Guerrero, E. J. Fajer-Ávila. 2018. Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Adecto®) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bulls eye puffer fish. *Aquaculture.* 492:361-368.

Müller-Graf, C., D. Candiani, S. Barbieri, O. Ribó, A. Afonso, E. Aiassa, P. Have, S. Correia, F. De-Massis, T. Grudnik, J. Serranota. 2007. Risk assesment in animal welfare – EFSA approach. *Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.* 14:789-794.

Müller-Graf, C., F. Berthe, T. Grudnik, E. Peeler, A. Afonso. 2012. Risk assessment in fish welfare, applications and limitations. *Fish Physiol Biochem.* 38:231-241.

- Müller, R. H., M. Radtke, S. A. Wissing. 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm.* 242:121-128.
- Murugami, J. W., R. M. Waruiru, P. G. Mbutia, K. W. Maina, A. G. Thaiyah, S. K. Mavuti, R. O. Otieno, H. A. Ngoni, R. H. Mdegela. 2018. Helminth parasites of farmed fish and water birds in Kirinyaga County, Kenya. *Int J Fish Aquat Stud.* 6(3):06-12.
- Ottinger, M., K. Clauss, C. Keuner. 2016. Aquaculture: relevance, distribution, impacts and spatial assessments – A review. *Ocean Coast Manage.* 119:244-266.
- Pedini Fernando-Criado, M. 1984. Informes nacionales sobre el desarrollo de la acuicultura en América Latina. *FAO Inf. Pesca Supl.* 294(1):138p.
- Peeler, E. J., A. G. Murray, A. Thebault, E. Brun, A. Giovaninni, M. A. Thursh. 2007. The application of risk analysis in aquatic animal health management. *Prev Vet Med.* 81(1-3):3-20.
- Ping, G., G. Xia, Z. Bao, C. Feng, X. Cheng, M. Kong, Y. Liu. 2016. Chitosan based nanoparticles as protein carriers for efficient oral antigen delivery. *Int J Biol Macromol.* 91:716-723.
- Praziquantel-600. Formulario Nacional de medicamentos. Infomed. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Consultado el 23 de septiembre de 2017 en: <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=95>.
- Primavera, J. H. 2006. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. *Ocean Coast Manage.* 49(9-10):531-545.
- Quiñones-Arreola, M. F., G. Arcos-Ortega, V. Gracia-López, R. Casillas-Hernández, C. Weirich, T. Morris, M. Díaz-Tenorio, C. Ibarra-Gámez. 2015. Reproductive broodstock performance and egg quality of wild-caught and first-generation domesticated *Seriola rivoliana* reared under same culture conditions. *Lat Am J Aquat Res.* 43:953-962.
- Reyes-Becerril, M., E. Alamillo, A. Trasviña, I. Hirono, H. Kondo, W. Jirapongpaioj, F. Ascencio-Valle., C. Angulo. 2017. *In vivo* and *in vitro* studies using larval and adult antigens from *Neobenedenia melleni* on immune response in yellowtail (*Seriola lalandi*). *J Fish Dis.* 2017:13.
- Ribeiro de Souza, A. L., C. P. Kiill, F. Kolenyak dos Santos, G. M. da Luz, H. Rocha e Silva, M. Chorilli, M. P. Daflon Gremião. 2012. Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment. *Curr Nanosci.* 9:512-519.

Ribeiro de Souza, A. L., T. Andreani, F. M. Nunes, D. Lopes-Cassimiro, A. E. de Almeida, C. A. Ribeiro, V. H. Vitoriano-Sarumento, M. P. Daflon-Gremião, A. M. Silva, E. B. Souto. 2012. Loading of Praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles. *J Therm Anal Calorim.* 108: 353-360.

Ribeiro de Souza, A. L., T. Andreani, R. Nunes de Oliveira, C. P. Kiill, F. Kolenyak dos Santos, S. Marques Allegretti, M. V. Chaud, E. B. Souto, A. M. Silva, M. P. Daflon Gremião. 2014. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of schistosomiasis treatment. *Int J App Pharm.* 463:31-37

Rivas-Aravena, A., Y. Fuentes, J. Cartagena, T. Brito, V. Poggio, J. La-Torre, H. Mendoza, F. González-Nilo, A. M. Sandino, E. Spencer. 2015. Development of a nanoparticle-based oral vaccine for Atlantic salmon against ISAV using alphavirus replicon as adjuvant. *Fish Shellfish Immun.* 45:157-166.

Roo, J., E. Grossi, D. Schuchardt, J. A. Socorro, C. M. Hernández-Cruz, M. S. Izquierdo, H. Fernández-Palacios. 2010. Potential of almako jack *Seriola rivoliana* as a fast-growing species for European aquaculture diversification. Conference Paper. DOI: 10.13140/2.1.3260.1609.

Roo, J., H. Fernández-Palacios, C. M. Hernández-Cruz, A. Mesa-Rodríguez, D. Schuchard, M. Izquierdo. 2014. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquacult Res.* 45:689-700.

Scholz, T. 1999. Parasites in cultured and feral fish. *Vet Parasitol.* 84(3-4):317-335.

Shalan, M., M. Saleh, M. El-Mahdy, M. El-Matbouli. 2016. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: a review. *Nanomedicine: NBM.* 12:701-710.

Sicuro, B., U. Luzzana. 2016. The *Seriola spp.* other than yellowtail (*S. quinquerradiata*) farming in the world. *Rev Fish Sci Aquac.* 24(4):314-325.

Sinche-Chele, F., V. Vera-Vera, J. E. Blacio-Game. 2009. Cultivo de huayaípe, *Seriola rivoliana*, en piscinas provistas de geomembranas. Repositorio Dspace. Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales. Consultado en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/1752>.

- Smith-Vaniz, W. F. 2002. Carangidae (Jacks and scads - bumpers, pompanos, leatherjacks, amberjacks, pilotfishes, rudderfishes). The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic. Volume 3 Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. Editorial K. E. Carpenter. FAO, Roma, Italia. pp 1426-1468.
- Symonds, J. E., S. P. Walker, S. Pether, Y. Gublin, D. McQueen, A. King, G. W. Irvine, A. N. Setiawan, J. A. Forsthe, M. Bruce. 2015. Developing yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and hapuku (*polyprion oxygeneios*) for New Zealand aquaculture. New Zeal J Mar Fresh. 48(3):371-384.
- Talegaonkar, S., A. Bhattacharyya. 2019. Potential of lipid nanoparticles (SLNs and NLCs) in enhancing oral bioavailability of drugs with poor intestinal permeability. AAPS Pharm Sci Tech. 20:120-135.
- Tamjidi, F., M. Shahedi, J. Varshosaz, A. Nasirpour. 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. Innov Food Sci Emerg Technol. 19:29-43.
- Timi, J. T., K. Mackenzie. 2015. Parasites in fisheries and mariculture. Parasitology. 142:1-4.
- Trasviña-Moreno, A. G., F. Ascencio, C. Angulo, K. S. Hutson, A. Avilés-Quevedo, R. B. Inohuye-Rivera, J. C. Pérez-Urbiola. 2017. Plant extracts as a natural treatment against the fish ectoparasite *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae). J Helminthol. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17001122>
- Trujillo-González, A., L. K. Johnson, C. C. Constantinoiu, K. S. Hutson. 2015. Histopathology associated with haptor attachment of the ectoparasitic monogenean *Neobenedenia* sp. (Capsalidae) to barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). J Fish Dis. 38:1063-1067.
- Tubbs, L. A., M. D. Tingle. 2006. Bioavailability and pharmacokinetics of a Praziquantel bolus in kingfish *Seriola lalandi*. Dis Aquat Org. 69:233-238.
- Vega-Villasante, F., A. Cupul-Magaña. 2014. Acuicultura, contexto y casos latinoamericanos. ISBN: 978-958-8437-06-4. 90p.
- Villarroel, M. 2012. Bienestar animal en peces: indicadores operativos. Revista AquaTIC. 37:107-112. ISSN 1578-4541.

Williams, R. E. 2009. Oral treatments for monogenean parasites of farmed yellowtails, *Seriola spp.* (Carangidae). Tesis (Doctorado). Adelaide, Australia. School of Earth and Environmental Sciences Universidad de Adelaide. 173pp.

Williams, R. E., I. Ernst, C. B. Chambers, I. D. Whittington. 2007. Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriolae* and *Benedenia seriolae* (Monogenea) in yellowtail *Seriola lalandi*. *Dis Aquat Org.* 77:199-205.

Whittington, I. D. 2004. The capsalidae (Monogenea: Monopisthocotylea): a review of diversity classification and phylogeny with a note about species complexes. *Folia Parasitol.* 51:109-122.

Yamamoto, S., S. Shirakashi, S. Morimoto, K. Ishimaru, O. Murata. 2011. Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture.* 319:53-57.

Zheng, M., M. Falkeborg, Y. Zheng, T. Yang, X. Xu. 2013. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 430:76-84.